

A téma címe:

Az ABCA1 membránfehérje funkciójának és fehérje-kölcsönhatásainak vizsgálata

Témavezető neve : **Dr. Szabó Katalin**

A kutatás időtartama: **2002. január 1. - 2005. december 31.**

TUDOMÁNYOS HÁTTÉR

Az ABC fehérjék családjába tartozó ABCA1 membránfehérje a lipidanyagcserében, ezen belül a koleszterin és egyes foszfolipidek transzmembrán mozgásában az egyik kulcs-szerepet játszó ABC transzporter (1-4). A Tangier-betegség hátterében az ABCA1 mutációi állnak (5-7). E ritka genetikai betegségben szenvedő emberek vérében a lipoprotein-szintek kóros értékeket mutatnak, a különböző szövetekben koleszterin szaporodik fel, változatos kór-formák alakulnak ki. Az elmúlt években megjelent eredmények, elsősorban a Tangier és más familiáris HDL-hiányos betegek, és az ABCA1 hiányos egerek vizsgálata bizonyította, hogy az ABCA1 mutációi a reverz koleszterin transzportban kulcsszerepet játszó HDL formák (emberben elsősorban ApoA1-tartalmú) képződésének hiánya miatt megnöveli az érlelmeszesedésre való hajlamot (8-11). Az érlelmeszesedés (ateroszklerózis) a fejlett országokban ma széles körben megjelenő betegség, következményei (szívinfarktus, angina pectoris, stroke, alsó végtagi érszűkület) a leggyakoribb halálokat jelentik. Természetesen mindez komoly kísérleti munkát indított el világszerte, hiszen a gyógyszerfejlesztés egyik lehetséges iránya olyan specifikus molekulák létrehozása, amelyek fokozzák az ABCA1 fehérje közvetítette, sejtből kifelé irányuló koleszterin-transzportot, és ezáltal megvédik a sejteket a koleszterin felhalmozódásától.

Már az ABCA1 vizsgálatainak korai szakaszában is felmerült, hogy e fehérje működésének hiánya nemcsak a koleszterin anyagcsere zavarait, hanem csökkent fagocitózist is okoz, a sejtek foszfatidilszerin (PS) expozíciójának befolyásolása révén (12,13). Az eukarióta sejtek jellemzője a foszfolipidek jellegzetes aszimmetrikus megoszlása a plazmamembrán két rétegében, a hibás sejtfelszíni PS expozíció szerepe számos betegség patomechanizmusában bizonyított (14-16). A jelátviteli folyamatok által aktivált membrán foszfatidilszerin transzlokáció alapvető fontosságú pl. a vérlemezke aggregációban, ill. az apoptotikus sejtek eltávolításában. A megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} szint hatására egyes sejtek 1-5 perc alatt bekövetkező, a külső plazmamembrán rétegben megjelenő "gyors" PS expozícióval reagálnak, míg apoptotikus hatások

eredményeként ez lassabban, legkorábban 20 perc elteltével következik be. A PS aszimmetrikus eloszlásának fenntartásában és ennek Ca^{2+} -függő megváltozásában amino-foszfolipid transzlokázok (P-típusú ATP-áz flippázok), scramblase-ek (a két membrán réteg foszfolipidjeit specificitás és irányultság nélkül összekeverő, Ca^{2+} -kötéssel aktiválható membránfehérjék) és feltehetően ABC transzporterek játszanak szerepet, de a folyamat mechanizmusa sem a gyors, sem a lassabb PS expozícióban nem tisztázott (2, 14 -19).

EREDMÉNYEK

A kutató munka célja az ABCA1 membránfehérje normális és kóros funkcióinak jellemzése, molekuláris mechanizmusának és sejten belüli kölcsönhatásainak feltérképezése volt. Az eredményekből eddig 3 cikk (összesített impakt faktor: 21,486, SCI: 23) és 7 konferencia-kiadvány született.

1. Az ABCA1 fehérje működésének vizsgálata Sf9 rovarsejt - bakulovírus expressziós rendszer felhasználásával

A pályázatban még kitűzött célként szerepelt, de a szerződés megkötésekor már befejezett és cikkben közölt munkában munkacsoportunk az ABCA1 membránfehérje termelését biztosító bakulovírus-Sf9 rovarsejt expressziós rendszert használva részletesen tanulmányozta e membránfehérje ATPáz aktivitását, az adenin nukleotid kötődését és az ún. nukleotid trapping jelenséget (20). A laboratóriumunkban korábban az ABC transzporter fehérjék tanulmányozására sikerrel alkalmazott kísérleti módszer módosításával (21-23), izolált rovarsejt membrán-vezikulákban direkt transzport méréseket is próbáltunk végezni izotóppal jelölt, ill. fluoreszcens koleszterin és foszfolipid modell-vegyületekkel (NBD-koleszterin, NBD-PS, NBD-PC), de a jel/zaj arány ebben a kísérleti rendszerben igen alacsony volt, részben a fenti vegyületek igen számottevő nem-specifikus kötődése miatt.

Az ABCA1 fehérje működésének vizsgálati eredményei az Sf9 rovarsejt - bakulovírus expressziós rendszer felhasználásával azt valószínűsítették, hogy az ABCA1 a család néhány más tagjához hasonlóan (CFTR, SUR) nem aktív transzporterként vesz részt a koleszterin és foszfolipidek transzportjában, hanem kölcsönhatásai révén szabályozza a koleszterin kiáramlást a sejtekből.

2. Az ABCA1 fehérje normális és kóros működésének vizsgálata különböző emlős sejttípusokban

Mivel az előző pontban leírtak szerint az Sf9-bakulovírus rendszerben termeltetett ABCA1 működésének vizsgálata nem vezetett további eredményekre, ezért az ABCA1 fehérje szerepét, normális és kóros működését több emlős sejttípusban, különböző sejtkörnyezetekben kívántuk vizsgálni. Ehhez szükségünk volt vad típusú és mutáns ABCA1 fehérje-termelést biztosító retrovirális expressziós rendszerek beállítására, valamint az ABCA1 variánsok expressziójának, intracelluláris lokalizációjának és működésének vizsgálatára alkalmas technikák kidolgozására.

2.A Új modellrendszerek kialakítása

2.A.1 Az ABCA1 fehérje emlős sejtekben történő expressziója

- Elkészítettünk egy új, Neo rezisztencát is kódoló retrovírus vektort és ebbe a vektorba klónoztuk a vad típusú és különböző mutáns ABCA1 cDNS-ét. Mivel az ABCA1 fehérjét felismerő rendelkezésünkre álló antitestek specificitása és érzékenysége emlős sejtekben nem volt megfelelő, ezért olyan mutáns ABCA1 cDNS-t is előállítottunk, amely egy jól használható, monoklonális antitest által specifikusan felismert rövid (8 aminosav) tag-et tartalmaz. A hemagglutinin-jelzéssel (HA) ellátott ABCA1 használatával egyértelműen megkülönböztethető az overexpresszált és a saját (endogén) ABCA1 fehérje emlős sejtekben, immunfluoreszcenciás jelölést alkalmazva is. Az ABCA1 fehérje 207-208. aminosava közé beékelte, a fehérje első extracelluláris hurkában levő HA-epitop lehetővé teszi az ABCA1 fehérje sejtfelszínen való megjelenésének és eltűnésének (degradáció, internalizáció) kvantitatív mérését, a fehérje sejtben belüli sorsának követését. Molekuláris biológiai módszerekkel olyan mutáns ABCA1 cDNS-eket állítottunk elő, amelyben a mutáció megfelel a Scott-betegben azonosított mutációnak (R1925Q), illetve amelyek konzervatív szekvenciákban ismert módon befolyásolják az ABC fehérjék működését (NBD mutánsok: K939M, K1952M és dupla K939/1952M mutánsok).
- Retrovírusokat termeltünk és stabil, szelektálható, különböző szintű ABCA1-expressziót mutató emlős sejtvonalakat hoztunk létre (MDCKII, HEK293, HeLa, EBV-transzformált B sejtpopulációk, sejtklónok). A kidolgozott módosított retrovirális expressziós rendszerrel (pakoló sejtek, transzdukciós és szelekciós módszerek változtatása) a nehezen transzdukálható emberi EBV-transzformált B sejtekben is sikerült az ABCA1 fehérje expressziója.

- Kidolgoztunk olyan hagyományos RT-PCR és valós idejű kvantitatív RT-PCR (real time, Light Cycler) módszereket, amelyek alkalmasak a vad típusú és a HA-jelölt ABCA1 transzkripciójának ellenőrzésére és megkülönböztetésére. A transzdukcióval előállított sejtvonalakban az ABCA1 expresszióját mRNS szinten e módszerekkel követtük.
- A vad típusú és a HA-jelzéssel ellátott ABCA1 fehérje emlős sejtekben történő expresszióját Western blot technikát alkalmazva mutattuk ki teljes sejtlizátumokban és membrán-preparátumokban.

2.A.2 Módszerek az ABCA1 fehérje emlős sejteken belüli lokalizációjának vizsgálatára

- Kidolgoztuk az extracelluláris HA-epitóppal jelölt ABCA1 fehérje sejtfelszíni megjelenésének kvantitatív mérését, immunfluoreszcens festéssel, áramlási citométer használatával. Az anti-HA antitest kötődését intakt sejtekhez és fixált, permeabilizált sejtekhez párhuzamosan vizsgálva meghatározható a plazmamembránban lokalizálódó fehérje mennyisége.
- Beállítottuk a HA-jelölt ABCA1 fehérje sejtben belüli lokalizációjának vizsgálatát intakt és permeabilizált sejtekben, immunfluoreszcens festéssel, konfokális mikroszkóp használatával. A sejtben belüli lokalizáció meghatározását az adott sejttípusra megfelelő lokalizációs és polarizációs markerek detektálásával végeztük (Na-K-ATPáz, ZO-1, human IgG fehérjét felismerő antitestekkel).
- Mivel a nem HA-jelölt ABCA1 fehérjén felszíni epitópot felismerő antitest nem beszerezhető, ezért megpróbáltunk ilyen anti-ABCA1 monoklonális antitestet készíteni Dr. Rajnavölgyi Évával együttműködésben. NIH3T3 sejtekből, majd Balb/C egér háttérű, jó antigénprezentáló tulajdonságú egér sejtvonalakból (2PK3 B limfóma és XS52 embrionális dendritikus sejtek) transzdukált, szelektált sejtklónokat készítettünk, amelyekben az mRNS és a fehérje expressziót RT-PCR és Western blot technikával ellenőriztük. Az extracelluláris HA epitóppal jelölt ABCA1 segítségével immunfluoreszcens festéssel, áramlási citométerrel ellenőriztük a fehérje lokalizációját párhuzamosan készült sejtvonalakban. Megfelelő mennyiségű felszíni expresszió esetén a sejtek felhasználhatóak lettek volna egerek immunizálására. Eddigi munkánkban sajnos ezekben a sejtvonalakban nem sikerült a sejtfelszínen kimutatható mennyiségben expresszálni az ABCA1 fehérjét, ezért a módszer további finomítása, hatékonyságának növelése szükséges az immunizációs kísérletekhez.

2.A.3 Teszt-rendszerek kifejlesztése az ABCA1 fehérje működésének vizsgálatára

- Beállítottuk intakt emlős sejtekben az ABCA1 működésére jellemző ApoA1-függő ^3H -koleszterin felszabadulás (efflux) mérését az ABCA1-et expresszáló és kontroll (csak a neomycin rezisztenciát hordozó) stabil sejtvonalak használatával.
- Beállítottuk intakt emlős sejtekben a sejtek plazmamembránjának külső rétegében megjelenő foszfatidilszerin mennyiségének kvantitatív meghatározását, fluoreszcens AnnexinV sejt felszíni kötődésének mérésével, mind áramlási citométer mind konfokális mikroszkóp használatával. A módszereket alkalmassá tettük a jelátviteli folyamatok által aktivált, megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} szint hatására bekövetkező "gyors" (1-5 perc) PS expozíció időbeli követésére.
- A fenti módszert módosítottuk és alkalmassá tettük a trombocita aktiváció vizsgálatára is. Az új, két paraméteres mérési módszer a PS expozíció és a trombocita mitokondriumok fluoreszcens festésének követésén alapul, áramlási citométer használatával.
- Megpróbáltuk beállítani az ABCA1 funkciójához kapcsolódó Apo-A1 fehérje sejt felszíni kötődésének áramlási citometriás vizsgálatát ABCA1-et expresszáló sejtvonalakon. Az igen magas nem-specifikus jelölés miatt ez a módszer nem volt megfelelő az ABCA1 működésének részletes vizsgálatához.

2.B Az ABCA1 normális és kóros működésének vizsgálata a membránfehérjét expresszáló emlős sejtvonalakban

A kidolgozott modellrendszerekben az ABCA1 fehérje funkcionális jellemzése céljából olyan mutációk hatását vizsgáltuk, amelyet egy Scott betegben azonosítottak, illetve amelyek konzervatív szekvenciákban ismert módon befolyásolják az ABC fehérjék működését. Kísérleti modellrendszereinkben megkezdtük a lipidanyagcserére ható vegyületek és gyógyszerek vizsgálatát, illetve más ABC fehérjék működését befolyásoló, az ABCA1 működését potenciálisan szabályozó anyagok hatását. Azonosítottunk két, eddig nem közölt PS expozíciót gátló vegyületet.

2.B.1 Bizonyítottuk, hogy az ABCA1 fehérjének szerepe van a foszfatidilszerin Ca^{2+} -indukált sejt felszíni expozíciójában.

Egy ritka, öröklődő vérzékenységi betegség, a Scott betegség tanulmányozásakor egy betegben erősen csökkent ABCA1 mRNS expressziót és

mutáns (R1925Q) ABCA1 jelenlétét mutatta ki a velünk együttműködésbe lépő Prof. C. Higgins munkacsoportja (MRC, London). A betegségre jellemző a Ca^{2+} -aktivált PS transzlokáció hibás működése, amely a véralvadáshoz szükséges trombocita aktiváció során kiemelkedő fontosságú lépés (19). Együttműködésünk első szakaszában a Scott betegből származó EBV-transzformált B sejtekből vad típusú ABCA1 fehérjét expresszáló stabil sejtvonalakat hoztunk létre. Az ABCA1 expresszióját mRNS szinten RT-PCR-rel követtük, és összehasonlítottuk a nyugalmi és a Ca^{2+} -indukált PS transzlokációt a sejtvonalakban. Kimutattuk, hogy a Scott betegből származó sejtekben a vad típusú ABCA1 expressziója helyreállította a hibás Ca^{2+} -indukált PS transzlokációt. Megállapítottuk, hogy a PS transzlokáció koncentrációfüggő módon gátolható egy ABCA1 gátlószer, a glyburide hatására (24-26). Mivel a glyburide egyéb ABC fehérjék működését is gátolja (pl. MDR1, ABCG2), ezért e fehérjékre specifikus inhibitorok hatását is megvizsgáltuk erre folyamatra, és kizártuk e transzporterek részvételét a PS expozícióban.

Eredményeinket cikkben közzétettük (27). Megállapításaink jelentőségét aláhúzza, hogy a közlemény a Blood július 15-i számának címlapjára került, eredményeinket kommentárban elemezték, mely elismeri, hogy elsőként mutattunk ki összefüggést egy vérzékenységi betegség és az ABCA1 működése között.

2.B.2 A kidolgozott mérési módszereket eredményesen alkalmaztuk más ABC fehérjék működésének vizsgálatára.

Az 2.A.2 és 2.A.3 pontokban bemutatott mérési módszereket az ABCG2, MRP6, ABCG1 és ABCG4 működésének vizsgálatára is eredményesen alkalmaztuk az ABC transzporterek szerkezetének és működésének vizsgálatával foglalkozó kutatócsoport tagjaival együttműködésben (Enzimológiai Intézet és OGYK). Az egyik ilyen munka eredményeit cikkben közzétettük (28).

2.B.3 Az ABCA1 fehérje Ca^{2+} -indukált foszfatidilszerin transzlokációban játszott szerepének további vizsgálata mutáns ABCA1 variánsok hatásának elemzésén keresztül.

Az 2.B.1 pontban bemutatott, közölt kísérletekben a jelöletlen, vad típusú ABCA1 expresszióját csak mRNS szinten illetve a megváltozott funkció alapján tudtuk bizonyítani. Az ABCA1 fehérje HA-jelzéssel ellátott formáját használva nemcsak az mRNS expresszió, hanem az EBV-transzformált B sejtekben tapasztalt igen alacsony szintű fehérje expresszió is kimutatható volt Western blot

technikával. A Scott betegből származó B sejtekből készült sejtvonalban kimutattuk a termelődő HA-jelölt ABCA1 fehérjét a sejtek plazmamembránjában, a sejten belüli lokalizációt immunfluoreszcens festéssel, konfokális mikroszkóppal vizsgálva.

Az alábbi eredmények bizonyították, hogy a HA-jelölt ABCA1 fehérje mind sejten belüli lokalizációjában, mind működésében a jelöletlen vad típusú ABCA1 fehérjével megegyezően viselkedik:

- A HA-jelölt ABCA1 expressziót mutató stabil MDCKII, HEK293 sejtvonalakban a termelődő fehérje túlnyomó többségét a plazmamembránban detektáltuk immunfluoreszcens festéssel, áramlási citométer és konfokális mikroszkóp használatával. A polarizáltan növesztett MDCKII kutyaese epitél sejtekben megállapítottuk, hogy az ABCA1 fehérje a sejtek bazolaterális plazma membránjában lokalizálható. Bár ez az eredményünk az első kísérleti bizonyíték volt az ABCA1 fehérje polarizált sejtekben való lokalizációjáról, vizsgálataink befejezése utáni héten megjelent Ohama és munkatársai közleménye, amelyben Caco-2 sejtekben kimutatták az endogén ABCA1 bazolaterális lokalizációját (29). Eredményeink azonossága bizonyította, hogy az ABCA1 fehérje 207-208. aminosava közé beékelte, a fehérje első extracelluláris hurkában levő HA-epitop nem változtatta meg az ABCA1 fehérje sejten belüli lokalizációját.
- Az ABCA1-et expresszáló MDCKII és HEK293 sejtekben összehasonlítottuk a jelzés nélküli ABCA1 és a HA-jelölt vad típusú ABCA1 fehérjék funkcióját. Az ABCA1 fehérje működésére jellemző ApoA1-függő ^3H -koleszterin kiáramlás mérésével megállapítottuk, hogy a HA-jelölt ABCA1 a jelöletlen ABCA1 fehérjével megegyező módon működőképes. Az ABCA1 expresszió ApoA1-függő koleszterin efflux növekedést okozott a sejtekben, amelynek mértéke az adott sejttípusra jellemző volt (feltehetően az endogén ABCA1 működésének és az ApoA1/ABCA1-független koleszterin metabolizmus/eltávolító mechanizmusokban levő különbségeknek tulajdoníthatóan). Az adott sejttípuson belül az ApoA1-függő ^3H -koleszterin efflux növekedésének mértéke a plazmamembránban megjelenő ABCA1 mennyiségével volt arányos.
- A Scott betegből származó EBV-transzformált B sejtekből készült sejtvonalban a HA-jelölt vad típusú ABCA1 expressziója a jelöletlen vad típusú ABCA1 hatásával megegyező módon helyreállította a hibás Ca^{2+} -indukált PS transzlokációt. Ezzel szemben az R1925Q mutáns ABCA1 expressziója, a vektor kontroll (csak neomycin rezisztenciát hordozó) sejtekével azonos módon, nem változtatta meg a Scott sejtek hibás PS expozícióját.

A nyugalmi és a Ca^{2+} -indukált PS transzlokációt elemezve megállapítottuk, hogy önmagában az ABCA1 expresszió nem okozott szignifikáns változást az MDCKII és HEK293 sejtek gyors Ca^{2+} -indukált PS transzlokációs képességében. Ugyanakkor más sejtkörnyezetben, olyan sejtípus használatával, amely egészséges sejt esetében képes a gyors Ca^{2+} -indukált PS transzlokációra bizonyítottuk, hogy az ABCA1 fehérjének szerepe van ebben a folyamatban (lásd *Eredmények, 3.B.1*). Ez megerősíti azt a korábbi eredményeinkből levonható következtetést (lásd *Eredmények, 1. pont*), hogy az ABCA1 nem aktív transzporterként működik, hanem kölcsönhatásai révén szabályozza a sejtek gyors Ca^{2+} -indukált PS expozícióját.

Az ABCA1 fehérje HA-jelzéssel ellátott formáját használva az ABCA1 variánsokat expresszáló sejt vonalakban összehasonlítható a fehérjeexpresszió szintje és a különböző mutáns fehérjék lokalizációja. A HA-jelölt ABCA1 mutánsok hatásának vizsgálatával tovább elemeztük az ABCA1 fehérje szerepét a Ca^{2+} -indukált PS transzlokációban.

Az 3.B.1 pontban leírt Scott beteg heterozigóta volt az R1925Q ABCA1 mutációra, s bár a beteg sejtjeiben az összes ABCA1 mRNS szintje, a vad típusú allél transzkripciója is erősen lecsökkent, felmerült a kérdés, hogy vajon a mutáció domináns negatív módon okozza-e a beteg sejtjeiben tapasztalható hibás Ca^{2+} -aktivált PS transzlokációt. A mutáció egy a humán, egér, patkány ABCA1-ben konzervatív RRKRK szekvenciát módosított, amely hasonlít a más fehérjékben ER retenciós szignálként azonosított RXXR motívumra (30). Az R1925Q ABCA1 mutáns HEK293 sejtekben kifejezve lokalizációs mutánsnak bizonyult, a vad típusú ABCA1-gyel szemben nem jutott ki a sejtek plazmamembránjába (27). A mutáció domináns negatív hatásának mechanizmusa megvalósulhat úgy, hogy a PS transzlokáció helyszínére, a plazmamembránba kijutni nem tudó R1925Q ABCA1 mutáns megakadályozza a PS expozícióhoz szükséges, vele együttműködésbe lépő fehérje/fehérjék működését (dimerképzéssel működő ABCA1 esetében a vad típusú ABCA1-et, vagy egyéb, a PS expozícióhoz szükséges eddig nem azonosított fehérjét/fehérjéket). Természetesen más mechanizmus is elképzelhető, amennyiben az R1925Q ABCA1 mutáció valóban domináns negatív módon működik.

E kérdés megválaszolására az R1925Q mutáns HA-jelölt formáját egészséges emberből származó, vad típusú endogén ABCA1-et kifejező EBV-transzformált B sejt vonalakban expresszáltuk. Kontrollként a csak neomycin rezisztenciát hordozó vektort és vad típusú HA-jelölt ABCA1-et expresszáltunk ezekben a sejtekben. Az ABCA1 expresszióját mRNS szinten RT-PCR-rel, fehérje szinten Western blottal

határoztuk meg, és összehasonlítottuk a nyugalmi és a Ca^{2+} -indukált PS transzlokációt a sejtvonalakban. Megállapítottuk, hogy az R1925Q mutáns expressziója nem befolyásolta szignifikánsan az egészséges B sejtek PS expozícióját, tehát a Scott beteg sejteinek hibás PS transzlokációját nem a mutáció domináns negatív hatása, hanem feltehetően a működőképes, megfelelően lokalizálódó ABCA1 erősen csökkent mennyisége okozza (amelyre a csökkent mRNS szint utal).

Az ABCA1 fehérje működésének módja, molekuláris mechanizmusa sem a sejtekből való koleszterin eltávolításban, sem a gyors Ca^{2+} -indukált PS transzlokációban nem ismert. Az utóbbi három évben megjelent eredmények szerint az ABCA1-függő koleszterin kiáramláshoz szükséges az ABCA1 és bizonyos apolipoproteinek helikális szerkezetű szakaszának kölcsönhatása (3,8,9), valamint az ABCA1 nukleotidkötő régióinak épsége (24,31), de a folyamat mechanizmusa továbbra is vitatott (2,3,5,8,9). A Chimini munkacsoport eredményei szerint a működőképes ABCA1 fehérje expressziója nagyon kicsi, de szignifikáns növekedést okozott a sejtek „nyugalmi” és Ca^{2+} -aktivált PS expozíciójában (12,13,26), ezzel szemben az ABC fehérjék egyik legjellemzőbb, konzervált Walker A motívumában mutáns ABCA1 fehérjék termelődése nem okozott ilyen változást (NBD mutánsok: K939M, K1952M és dupla K939/1952M). Ez azt valószínűsíti, hogy az ABCA1 fehérje nukleotidkötő régióinak épsége az ABCA1-függő PS expozícióhoz is szükséges. A mi kísérleti rendszerünkben, az egészséges B sejtekben az indukció hatására a kezdeti $9 \pm 4\%$ PS expozíció értéke $96 \pm 2\%$ változik az összes élő sejt arányában kifejezve, így ez a folyamat részletesebben elemezhető, kinetikailag is jobban jellemezhető, mint a fent ismertetett kísérleti rendszerekben.

Megvizsgáltuk, hogy a fenti NBD mutánsok expressziója befolyásolja-e a gyors Ca^{2+} -indukált PS transzlokáció működését. A HA-jelölt NBD mutánsokat MDCKII sejtekben és a Scott betegből származó B sejtvonalban expresszáltuk és ellenőriztük a fehérjék expresszióját, lokalizációját, és működését. (Az NBD mutáns fehérjék működését az ApoA1-függő koleszterin eltávolítás mérésével jelenleg ellenőrizzük.) A korábban leírt eredményekkel megegyezően, az NBD mutánsok a vad típusú ABCA1-hez hasonlóan elsősorban a plazmamembránban lokalizálódtak. Az NBD mutánsok expressziója nem állította helyre a Scott betegből származó sejtek hibás Ca^{2+} -indukált PS transzlokációját, tehát ezek a mutációk valóban megakadályozzák az ABCA1-függő PS expozíciót.

Az NBD mutánsokat egészséges emberből származó, vad típusú endogén ABCA1-et kifejező EBV-transzformált B sejtvonalakban expresszáltuk. Így

megállapíthattuk, hogy a plazmamembránban lokalizálódó, de működésképtelen ABCA1 overexpressziója önállóan képes-e a Ca^{2+} -aktivált PS transzlokáció hibáját okozni. Az ABCA1 variánsok expresszióját mRNS szinten RT-PCR-rel, fehérje szinten Western blottal határoztuk meg, és részletesen vizsgáltuk a nyugalmi és az indukált PS transzlokációt a sejtvonalakban. Megállapítottuk, hogy az NBD mutánsok expressziója nem befolyásolta az egészséges B sejtekben bekövetkező PS expozíciót, még az endogén ABCA1 expresszióját meghaladó expresszió esetén sem. Ha az ABCA1 fehérje nem önállóan, aktív transzporterként, hanem más fehérjékkel való kölcsönhatáson keresztül szabályozza ezt a folyamatot, ennek a kölcsönhatásnak a működéséhez is szükséges a nukleotidkötő régiók épsége. Eredményeink alternatív magyarázata szerint továbbra sem zárható ki, hogy az ABCA1 fehérje önállóan, aktív transzporterként működik, a PS expozíció változatlan működéséhez elegendő volt az endogén vad típusú ABCA1 működése, amelyet a mutánsok expressziója nem befolyásolt.

A fenti eredmények egyes részeit több nemzetközi és magyar konferencián, posztereken és előadásban mutattuk be. A 2.B.3 pontban összefoglalt eredményeket a közeljövőben cikkben közölni kívánjuk. Kérjük, hogy ezt a közleményt a jelentés minősítésében (a közlemény elfogadásakor, kiegészítő eljárásban) vegyék figyelembe.

2.C Az ABCA1 fehérje szerepe és működése emberi trombocitákban

A vérárvadáshoz szükséges trombocita-aktiváció során a Ca^{2+} -indukált PS expozíció kiemelkedő fontosságú lépés, de e folyamat mechanizmusa nem ismert (14,17,19,32). Kísérleteink kezdetekor az ABCA1 fehérje részvételét e folyamatban olyan eredmények valószínűsítették, amelyek arról számoltak be, hogy az ABCA1 fehérje működése befolyásolja a sejtek PS expozícióját (12,13,33). Eredményeink (27) megerősítették, hogy az ABCA1 fehérje fontos szerepet játszik a jelátviteli folyamatok által aktivált PS expozícióban, amely alapvető fontosságú a vérlemezke aggregációban, ill. az apoptotikus sejtek eltávolításában. A szervezet lipid-háztartása szerepet játszik a trombociták aktivációjában és működésében (32), egyes eredmények az ABCA1 és más ABC fehérjék trombocitákban való működését is sugallják (2,34-37), de a lipidek és foszfolipidek transzmembrán mozgásáért felelős fehérjék szerepe és működése kevésbé ismert (2, 5,14,15,18,38).

A jelátviteli folyamatok által aktivált PS expozícióban résztvevő endogén fehérjék azonosítására, e folyamat mechanizmusának tanulmányozására a

trombocita aktiváció vizsgálata kézenfekvő modellrendszer, ezért megkezdjük az ABCA1 fehérje szerepének és működésének további elemzését emberi trombocitákban és különböző érettségi állapotú megakarioblaszt sejtvonalakban.

Kísérleteinkben megvizsgáltuk különböző ABC membránfehérjék expresszióját emberi trombocitákból és számos hematopoetikus sejtvonalból készült teljes sejtlizátumban és membránpreparátumban, Western blot technikát alkalmazva. Eredményeink szerint nagy mennyiségű endogén ABCA1 expresszálódik az emberi trombocitákban és kimutattuk az ABCG2, ABCG8, MRP1, MDR1, MDR3 fehérjéket is. Különböző mennyiségű ABCA1, ABCG2, ABCG8, MRP1, MRP3, MDR1 és MDR3 fehérje mutatható ki a differenciációban a trombocitákhoz legközelebb álló korai érettségi állapotú megakarioblaszt sejtvonalakban is (CHRF, Meg-1).

A trombocita aktiváció vizsgálatára kidolgozott új mérési módszerrel, (2.A.3 pont) megvizsgáltuk feltételezett ABCA1 inhibitorok hatását az emberi trombocita aktiváció során bekövetkező PS transzlokációra. Megállapítottuk, hogy az egyik feltételezett ABCA1 inhibitor gátolja ezt a folyamatot.

Munkánk kezdete óta megjelent Nofer és munkatársai közleménye, amely beszámol az ABCA1 fehérje trombocitákban való expressziójáról és bemutatja, hogy az ABCA1 fehérje működésének hiánya csökkent trombocita funkciókat is okoz (34). Ez megerősíti eddigi eredményeinket. Tervezett további vizsgálatainkban a megakarioblaszt sejtvonalak differenciációja során követjük az ABC fehérjék expressziójának változását párhuzamosan a sejtek Ca^{2+} -indukált PS transzlokációs képességének változásával, és megvizsgáljuk specifikus ABC-inhibitorok hatását erre a folyamatra. Az emberi trombocitákban és a különböző differenciációs állapotú megakarioblaszt sejtekben követjük az ABC fehérjék specifikus transzport aktivitásának változásait olyan mérési módszerekkel, amelyeket az ABC transzporterekkel foglalkozó kutatócsoport korábban kifejlesztett (21-23,39,40).

3. Az ABCA1 fehérje PDZ fehérjékkel kialakuló kölcsönhatásainak vizsgálata

3.A Az ABC fehérjék működésében, molekulák sejtekbe történő felvételének és leadásának, a sejtek közötti információátvitel szabályozásában számos adat mutat a fehérje-fehérje kölcsönhatások kiemelkedő jelentőségére (41-48). Így a CFTR regulációs szerepében, a TAP komplex kialakulásában, a SUR (ABC transzporter) és egy specifikus K-csatorna kölcsönhatásában, de az MRP típusú fehérjék működésében is szerepet játszanak ezek a kölcsönhatások. A fehérje-komplexek szerveződéséért elsősorban domének közötti kölcsönhatások felelősek. Az ún. PDZ domén jellemzően a (Ser/Thr)-X-(Val/Leu/Phe) C-terminális szekvenciát, az

ún. PDZ-kötő motívumot ismeri fel, és ezzel lép magas affinitású kölcsönhatásba (48-52). Az emberi ABCA1 fehérjében nem szigorúan típusos, de jól felismerhető PDZ motívum található (KESYV-COOH), amely jó eséllyel fontos intracelluláris kölcsönhatások kialakulását eredményezi. Ennek az ABCA1 fehérje C-terminális régiójában található PDZ-kötő motívum PDZ fehérjékkel kialakuló kölcsönhatásait tanulmányoztuk.

Sf9 rovarsejt - bakulovírus expressziós rendszer segítségével nagy mennyiségben állítottuk elő az ABCA1 fehérjét. A vírusokat megklónoztuk, a legmagasabb fehérje-expressziót eredményező vírus klónokat alkalmaztuk. Az Sf9 sejtekből membrán-preparátumokat készítettünk. In vitro biokémiai kötésvizsgálat-módszerekkel (membrán-overlay, pull-down vizsgálatok) jellemeztük az ABCA1 fehérje C-terminális régiójában található PDZ-kötő motívum különböző PDZ fehérjékkel kialakuló kölcsönhatásait összehasonlítva más, PDZ kötő motívummal rendelkező ABC transzporterek ilyen kölcsönhatásaival. Megállapítottuk, hogy egy bazolaterális elhelyezkedésű, a legtöbb sejtben előforduló speciális PDZ fehérje (β 2-syntrophin) a vizsgált ABC transzporterek közül egyedül az ABCA1 fehérjével lép kölcsönhatásba. Eredményeink szerint a polarizált sejtekben apikálisan elhelyezkedő más ABC transzporterekhez kötő egyéb PDZ fehérjék (EBP50, E3KARP, PDZK1, IKEPP) nem kötődtek az ABCA1 membránfehérjéhez. Eredményeinket cikk formájában közzétettük (53).

3.B A PDZ doméneket tartalmazó, alapvetően citoplazmikus fehérjékre gyakran igaz, hogy a sejtmembrán egy-egy speciális részében helyezkednek el (szinapszis, sejt-sejt kapcsolatok, apikális membrán). A PDZ fehérjék szerepet játszanak a sejtmembrán alkotórészeinek szervezésében, egyes fehérjék a plazmamembrán megfelelő területére történő irányításában és eltávolításában, és működésük jelátviteli folyamatokkal való összekapcsolásában (43,44,47,49,50). Mivel magas affinitású PDZ kölcsönhatást mutattunk ki a β 2-syntrophin és az ABCA1 fehérje között, ezért a 2. pontban ismertetett emlős expressziós rendszer felhasználásával megkezdtük a kölcsönhatás funkcionális és lokalizációs következményeinek vizsgálatát.

- Far-Western technikával ellenőriztük, hogy a stabil emlős MDCKII sejtvonalakban termelődő jelöletlen és a HA-jelölt ABCA1 fehérje is köti a bakteriális rendszerben termeltetett, GST-konjugált formában előállított tisztított β 2-syntrophint.

- A 2.B.3 pontban bemutatott eredmények bizonyították, hogy a HA-jelölt ABCA1 fehérje a jelöletlen vad típusú ABCA1–gyel megegyezően működik és a HA-tag nem változtatta meg az ABCA1 fehérje sejten belüli lokalizációját sem.
- Megvizsgáltuk a polarizáltan növesztett MDCKII sejtekben az ABCA1-gyel magas affinitású PDZ kölcsönhatásba lépő β 2-syntrophin és az e fehérjével ismert fehérje-komplexeket képező egyéb fehérjék (utrophin, más syntrophin-ok, dystroglycanok) sejten belüli lokalizációját. Kimutattuk a β 2-syntrophin és az utrophin bazolaterális ko-lokalizációját az HA-jelzéssel ellátott ABCA1-gyel. Az ABCA1 overexpresszió nem módosította e fehérjék lokalizációját. Az eddig vizsgált potenciális szabályozó anyagok közül egyedül a foszforilációt módosító okadánsav befolyásolta kis mértékben az ABCA1 lokalizációját, a konfokális mikroszkópos kép alapján feltehetően a fehérje internalizációjára való hatás következtében.

Ezen a nagyon „forró” kutatási területen szinte naponta jelennek meg újabb közlemények. Sajnos, mire eddig eljutottunk, Munehira és mtársai közölték az α 1-syntrophin és az ABCA1 fehérje kölcsönhatásának az ABCA1 fehérje turnover-ére gyakorolt hatását (54), a β 1- és β 2-syntrophin valamint az utrophin expressziójának szabályozó hatását az ABCA1 fehérje mennyiségére és az ABCA1-függő koleszterin kiáramlásra pedig Okuhira és mtársai közölték 2005-ben (55). Időközben közlemények sora jelent meg arról, hogy az ABCA1 fehérje működését a sejtek nemcsak expressziós szinten, hanem a fehérje degradációjának, lokalizációjának szabályozásával is szoros ellenőrzés alatt tartják poszt-transzlációs módosításokkal (foszforiláció, fehérje-fehérje kölcsönhatások, 56-65).

Hivatkozott irodalom

1. Knight BL: ATP-binding cassette transporter A1: regulation of cholesterol efflux. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 124-7 (2004)
2. Pohl A, Devaux PF, Herrmann A: Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochim Biophys Acta* 1733, 29-52 (2005)
3. Takahashi K, Kimura Y, Nagata K, Yamamoto A, Matsuo M, Ueda K: ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis. *Med Mol Morphol.* 38, 2-12 (2005)
4. Srivastava N: ATP binding cassette transporter A1--key roles in cellular lipid transport and atherosclerosis. *Mol. Cell. Biochem.* 237, 155-164 (2002)

5. Nofer JR, Remaley AT: Tangier disease: still more questions than answers. *Cell Mol Life Sci.* 62, 2150-60 (2005)
6. Oram JF: Molecular basis of cholesterol homeostasis: lessons from Tangier disease and ABCA1. *Trends. Mol. Med.* 8, 168-173 (2002)
7. Oram JF: Tangier disease and ABCA1. *Biochim. Biophys. Acta.* 1529, 321-330 (2000)
8. Lee JY, Parks JS: ATP-binding cassette transporter A1 and its role in HDL formation. *Curr. Opin. Lipidol.* 16, 19-25 (2005)
9. Yokoyama S: Assembly of high density lipoprotein by the ABCA1/apolipoprotein pathway. *Curr Opin Lipidol.* 16, 269-79 (2005)
10. Schmitz G, Langmann T: High-density lipoproteins and ATP-binding cassette transporters as targets for cardiovascular drug therapy. *Curr Opin Investig Drugs.* 6, 907-19 (2005)
11. Oram JF, Heinecke JW: ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev.* 85, 1343-72 (2005)
12. Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti SF, Chaslin JM, Freyssinet P, Devaux, Neish J, Marguet D, Chimini G: ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat. Cell Biol.* 2, 399– 406 (2000)
13. Hamon Y, Chambenoit O, Chimini G: ABCA1 and the engulfment of apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1585, 64-71 (2002)
14. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM: Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci.* 62, 971-88 (2005)
15. Balasubramanian K, Schroit AJ: Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 701-734 (2003)
16. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C: A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2, 965-975 (2002)
17. Sims P J, Wiedmer T: Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb. Haemost.* 86, 266–275 (2001)
18. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF: Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 1439, 317-330 (1999)
19. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM: Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta.* 1636, 119-28 (2004)
20. Szakács G, Langmann T, Özvegy C, Orsó E, Schmitz G, Váradi A, Sarkadi B: Characterization of the ATPase cycle of human ABCA1: implications for its function as a regulator rather than an active transporter. *Biochem Biophys Res Commun.* 288, 1258-1264 (2001)

21. Bakos É, Evers R, Szakács G, Tusnády GE, Welker E, Szabó K, de Haas M, van Deemter L, Borst P, Váradi A, Sarkadi B: Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* 273, 32167-32175 (1998)
22. Sharom FJ, Yu X, Liu R, Chu JWK, Szabó K, Müller M, Seprődi J, Sarkadi B: Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems, and intact cells. *Biochem. Pharmacol.* 58, 571-586 (1999)
23. Özvegy C, Váradi A, Sarkadi B: Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J Biol Chem.* 277, 47980-47990 (2002)
24. Wang N, Silver DL, Thiele C, Tall AR: ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J Biol Chem.* 276, 23742-23747 (2001)
25. Marguet D, Luciani MF, Moynault A, Williamson P, Chimini G: Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocyte and prey. *Nat Cell Biol.* 7, 454-6 (1999)
26. Alder-Baerens N, Muller P, Pohl A, Korte T, Hamon Y, Chimini G, Pomorski T, Herrmann A: Headgroup-specific exposure of phospholipids in ABCA1-expressing cells. *J Biol Chem.* 280, 26321-9 (2005)
27. Albrecht C, McVey JH, Elliott JI, Sardini A, Kasza I, Mumford AD, Naoumova RP, Tuddenham EGD, Szabó K, Higgins CF: A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood* 106, 542-549. (2005)
28. Elkind NB, Szentpétery Zs, Apáti Á, Özvegy-Laczka Cs, Várady Gy, Ujhelly O, Szabó K, Homolya L, Váradi A, Buday L, Kéri Gy, Német K, Sarkadi B: Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Res.* 65, 1770-1777 (2005)
29. Ohama T, Hirano K, Zhang Z, Aoki R, Tsujii K, Nakagawa-Toyama Y, Tsukamoto K, Ikegami C, Matsuyama A, Ishigami M, Sakai N, Hiraoka H, Ueda K, Yamashita S, Matsuzawa Y: Dominant expression of ATP-binding cassette transporter-1 on basolateral surface of Caco-2 cells stimulated by LXR/RXR ligands. *Biochem Biophys Res Commun.* 296, 625-30 (2002)
30. Michelsen K, Yuan H, Schwappach B: Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Rep.* 8, 717-22. (2005)
31. Chambenoit O, Hamon Y, Marguet D, Rigneault H, Rosseneu M, Chimini G: Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. *J Biol Chem.* 276, 9955-9960 (2001)
32. Miller GJ: Dietary fatty acids and the haemostatic system. *Atherosclerosis.* 179, 213-27 (2005)

33. Zha X, Genest JJr, McPherson R: Endocytosis is enhanced in Tangier fibroblasts: possible role of ATP-binding cassette protein A1 in endosomal vesicular transport. *J. Biol. Chem.* 276, 39476-39483 (2001)
34. Nofer JR, Herminghaus G, Brodde M, Morgenstern E, Rust S, Engel T, Seedorf, U, Assmann G, Bluethmann H, Kehrel BE: Impaired platelet activation in familial high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *J Biol Chem.* 279, 34032-7 (2004)
35. Sasaki M, Shoji A, Kubo Y, Nada S, Yamaguchi A: Cloning of rat ABCA7 and its preferential expression in platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 16, 304, 777-82 (2003)
36. Jedlitschky G, Tirschmann K, Lubenow LE, Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Greinacher A, Kroemer HK: The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. *Blood.* 104, 3603-10 (2004)
37. Kalin N, Fernandes J, Hrafnisdottir S, van Meer G: Natural phosphatidylcholine is actively translocated across the plasma membrane to the surface of mammalian cells. *J Biol Chem.* 279, 33228-36. (2004)
38. Stefkova J, Poledne R, Hubacek JA: ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol. Res* 53, 235-43 (2004)
39. Homolya L, Holló Z, Germann UA, Pastan I, Gottesman MM, Sarkadi B: Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. *J Biol Chem.* 268, 21493-21496 (1993)
40. Holló Z, Homolya L, Davis CW, Sarkadi B: Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1191, 384-388 (1994)
41. Schmitz G, Buechler C: ABCA1: regulation, trafficking and association with heteromeric proteins. *Ann Med.* 34, 334-47 (2002)
42. Wang N, Tall AR: Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23, 1178-84 (2003)
43. Li C, Naren AP: Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacol Ther* 108, 208-23 (2005)
44. Guggino WB: The cystic fibrosis transmembrane regulator forms macromolecular complexes with PDZ domain scaffold proteins. *Proc Am Thorac Soc.* 1, 28-32 (2004)
45. Moreau C, Prost AL, Derand R, Vivaudou M: SUR, ABC proteins targeted by KATP channel openers. *J Mol Cell Cardiol.* 38, 951-63 (2005)
46. Sheng M, Pak DT: Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. *Annu Rev Physiol.* 62, 755-78 (2000)
47. Fanning AS, Anderson JM: Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 432-9 (1999)

48. Kato Y, Watanabe C, Tsuji A: Regulation of drug transporters by PDZ adaptor proteins and nuclear receptors. *Eur J Pharm Sci.* Dec 20 [Epub ahead of print] (2005)
49. Bezprozvanny I, Maximov A: PDZ domains: More than just a glue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 787-9 (2001)
50. Biber J, Gisler SM, Hernando N, Murer H: Protein/protein interactions (PDZ) in proximal tubules. *J. Membr. Biol.* 203, 111-8 (2005)
51. Sudol M: From Src homology domains to other signaling modules: proposal of the "protein recognition code". *Oncogene* 17, 1469-1474 (1998)
52. Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC: Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275, 73-76. (1997)
53. Hegedűs T, Sessler T, Scott R, Thelin W, Bakos É, Váradi A, Szabó K, Homolya L, Milgram SL, Sarkadi B: C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 302, 448-455 (2003)
54. Munehira Y, Ohnishi T, Kawamoto S, Furuya A, Shitara K, Imamura M, Yokota T, Takeda S, Amachi T, Matsuo M, Kioka N, Ueda K: Alpha1-syntrophin modulates turnover of ABCA1. *J. Biol. Chem.* 279, 15091–15095 (2004)
55. Okuhira K, Fitzgerald ML, Sarracino DA, Manning JJ, Bell SA, Goss JL, Freeman MW: Purification of ATP-binding cassette transporter A1 and associated binding proteins reveals the importance of beta1-syntrophin in cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 280, 39653-64 (2005)
56. Arakawa R, Yokoyama S: Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. *J. Biol. Chem.* 277, 22426–22429 (2002)
57. Haidar B., Denis M., Krimbou, L., Marcil M, Genest J: cAMP induces ABCA1 phosphorylation activity and promotes cholesterol efflux from fibroblasts. *J Lipid Res.* 43, 2087-94 (2002)
58. See RH, Caday-Malcolm RA, Singaraja RR, Zhou S, Silverston A, Huber MT, Moran J, James ER, Janoo R, Savill JM, Rigot V, Zhang LH, Wang M, Chimini G, Wellington CL, Tafuri SR, Hayden MR: *J. Biol. Chem.* 277, 41835-41842 (2002)
59. Yamauchi Y, Hayashi M, Abe-Dohmae S, Yokoyama, S: Apolipoprotein A-I Activates Protein Kinase C Signaling to Phosphorylate and Stabilize ATP Binding Cassette Transporter A1 for the High Density Lipoprotein Assembly. *J. Biol. Chem.* 278, 47890–47897 (2003)
60. Martinez LO, Agerholm-Larsen B, Wang N, Chen W, Tall AR: Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I. *J. Biol. Chem.* 278, 37368–37374 (2003)
61. Wang N, Chen W, Linsel-Nitschke P, Martinez LO, Agerholm-Larsen B, Silver DL, Tall AR.: A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by

- calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. *J. Clin. Invest.* 111, 99–107 (2003)
62. Arakawa R, Hayashi M, Remaley AT, Brewer BH Jr, Yamauchi Y, Yokoyama S: Phosphorylation and Stabilization of ATP Binding Cassette Transporter A1 by Synthetic Amphiphilic Helical Peptides. *J. Biol. Chem.* 279, 6217–6220 (2004)
63. Roosbeek S, Peelman F, Verhee A, Labeur C, Caster H, Lensink MF, Cirulli C, Grooten J, Cochet C, Vandekerckhove J, Amoresano A, Chimini G, Tavernier J, Rosseneu M.: Phosphorylation by protein kinase CK2 modulates the activity of the ATP binding cassette A1 transporter. *J Biol Chem.* 279, 37779-88 (2004)
64. Chen W, Wang N, Tall AR: A PEST deletion mutant of ABCA1 shows impaired internalization and defective cholesterol efflux from late endosomes. *J Biol Chem.* 280, 29277-81 (2005)
65. Wang Y, Oram JF: Unsaturated fatty acids phosphorylate and destabilize ABCA1 through a phospholipase D2 pathway. *J Biol Chem.* 280, 35896-903 (2005)

A szerződésben szereplő eredeti kutatási tervtől való kismértékű eltérés indoklása:

A PDZ kölcsönhatás funkcionális és lokalizációs következményeinek további vizsgálatát, és az ABCA1 foszforilációjának a fehérje működésében játszott szerepének elemzését azért nem folytattuk, mert e vizsgálatainkkal egyidejűleg Munehira és mtársai közölték az α 1-syntrophin és az ABCA1 fehérje kölcsönhatásának az ABCA1 fehérje turnover-ére gyakorolt hatását (54), a β 1- és β 2-syntrophin valamint az utrophin expressziójának szabályozó hatását az ABCA1 fehérje mennyiségére és az ABCA1-függő koleszterin kiáramlásra pedig Okuhira és mtársai közölték (55). Időközben közlemények sora jelent meg arról, hogy az ABCA1 fehérje működését a sejtek nemcsak expressziós szinten, hanem a fehérje degradációjának, lokalizációjának szabályozásával is szoros ellenőrzés alatt tartják poszt-transzlációs módosításokkal (foszforiláció, fehérje-fehérje kölcsönhatások, 56-65).

Mivel eredményeink azt bizonyították, hogy az ABCA1 fehérjének szerepe van a fiziológiásan fontos jelentőségű Ca^{2+} -indukált sejt felszíni foszfatidilszerin expozícióban, ezért további munkánkban az ABCA1 fehérje szerepét és működését vizsgáltuk ebben a folyamatban, illetve megkezdtuk az ABCA1 és más ABC fehérjék szerepének elemzését a trombociták aktivációjában.

A szerződésben szereplő eredeti tervezettől eltérő költségfelhasználás indoklása:

A szerződésben 2003-ban eredetileg szereplő költségtervtől való eltérést (3.1. külföldi utazás:+172eFt) az indokolta, hogy 2003-ban együttműködő partnerünk (Christiane Albrecht, C. Higgins laboratóriuma, London) látogatott Budapestre saját költségén. Az így fennmaradó összeget nem egyéb konferencián való részvételre fordítottuk, hanem a közös munka kapcsán részben ránk háruló költségeket fedeztük belőle (3.2. készletbeszerzés -162eFt). Mivel ez az eredményes együttműködés 2003-ban alakult ki, a készletbeszerzésben a szerződés megkötésekor még nem terveztük előre.

A szerződésben eredetileg szereplő 2004 évi költségtervtől való eltérés indoka (külföldi utazás és napidíj:+145eFt), hogy a 2005-ben előre láthatóan a tervezettnél magasabb konferencia és utazási költségekre számítottunk (FEBS konferencia, részvétel a European Lipidomics Initiative megnyitó ülésén). Ezt az összeget 2005-ben ennek megfelelően felhasználtuk (7e Ft-tal többet, mert a kiadásokat nem tudtuk ilyen pontossággal előre megállapítani).

A szerződésben tervezettől eltérő résztvevők indoklása:

A szerződés megkötése után vált nyilvánvalóvá, hogy a hatékony retrovírusos expresszió érdekében módosítani kellett az eredetileg használni kívánt retrovírus vektort a Neo szelekciót lehetővé tevő cDNS beépítésével. Szintén szükség volt a transzdukált emlős sejtekben a klónozott ABCA1 mRNS szintjét ellenőrző RT-PCR módszerek kidolgozására. A szerződésben eredetileg nem szereplő Klein Izabella és Arányi Tamás ezekben a munkákban közreműködött eredményesen, valamint szakmai tanácsaikkal segítették az ABCA1 fehérjével kapcsolatba hozható öröklődő betegségek vizsgálatát.

A szerződésben nem szereplő Sinkó Emese a konfokális mikroszkópos vizsgálatokban közreműködött, mivel az eredetileg szereplő Özvegy Csillát és Hegedűs Tamást 2003-ban lekötötte PhD fokozatuk megszerzése.

Hegedűs Tamás ezután az USA-ba tanulmányútra távozott, ezért 2003-tól hiányzik a pályázatban megadott résztvevők közül. Helyette 2004-től Iliás Attila vett részt a kutatásban.

Özvegy Csilla szülési szabadsága miatt 2005-ben Fülöp Krisztina csatlakozott a munkánkhoz. Cserepes Judit PhD hallgató szintén szülési szabadságra távozott. Helyette Kasza Ildikó PhD hallgató csatlakozott a kutatáshoz.

A szerződés megkötése után mind az Enzimológiai Intézetben működő munkacsoportban mind az OGYK-ban jelentős átszervezések zajlottak. Ennek eredményeképpen vett részt a munkákban Pétery Józsefné és 2004-ben Aradi Olga a szerződésben eredetileg résztvevőként megnevezett Kis Ferencné asszisztens helyett. Aradi Olga távozása miatt a mutáns ABCA1 konstrukciók expressziójához szükséges retrovírusokat Hugues de Boussac készítette.

Méhes Gabriella technikus munkája kiváltotta a szerződésben eredetileg szereplő Zombori Ilona asszisztens munkáját (Zombori Ilona sajnos súlyos közlekedési balesetet szenvedett.)